

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791253

研究課題名（和文） 免疫グロブリン由来制御性Tエpiteープによる免疫寛容機構の解明と臓器移植への応用

研究課題名（英文） Investigation to determine a mechanism for T cell regulatory effects induced by treatment with high-dose immunoglobulin injection after organ transplantation.

研究代表者

田中 友加（TANAKA YUKA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90432666

研究成果の概要（和文）：本研究は、免疫グロブリン大量投与療法による T 細胞制御機構を解明し、臓器移植における新規免疫抑制療法の開発を目標とした。ヒトリンパ球混合試験（MLR）を用い、IgG-Fc 部に HLA 拘束性の T 細胞応答抑制作用が存在することを確認した。そこで、IgG の C 末端 H 鎖 Peptide 289 を作成し評価したところ、T 細胞抑制効果は認めるものの、従来の免疫抑制剤に比べ優位ではなかった。また、IgG-Fc 部の免疫制御のメカニズムを解明するための、MLR による反応性 T 細胞の STAT シグナル伝達機構の解析系を開発した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we aimed to determine a mechanism of T cell regulatory effects induced by treatment with high-dose immunoglobulin injection after organ transplantation. By use of human lymphocyte reaction assay, we have proven that the Fc-part in IgG is responsible for the inhibiting effects on alloreactive T cells. We found that Peptide 289 inhibited proliferation of alloreactive T cells. However, its inhibitory extent was not comparable to conventional immunosuppressants. In addition, we developed a novel method to analyze STAT-signaling in alloreactive T cells in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：移植免疫学、腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

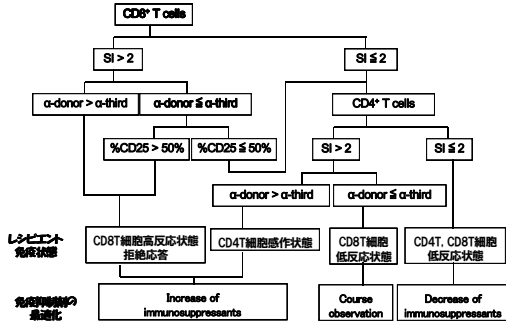
キーワード：免疫グロブリン、免疫寛容、臓器移植

1. 研究開始当初の背景

臓器移植後の感染症や悪性腫瘍の発生に関する問題を考慮すると、個々の免疫状態を適切に監視し、至適免疫抑制療法の実践が望まれる。

我々はこれまでに、肝臓移植後の免疫学的指標として、CFSE 蛍光色素染色法を用いたリンパ球混合試験 (CFSE-MLR) に基づくアルゴリズムを作成し、肝移植術後のレシピエントに対して必要最小限の免疫抑制療法を施行している (図1)。

図1. CFSE-MLRの結果に基づいたレシピエント免疫抑制状態評価のためのアルゴリズム

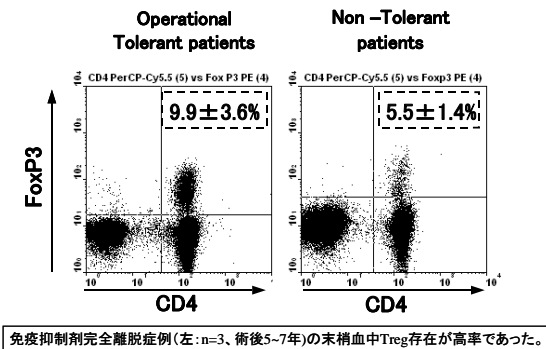


SI: Stimulation Index α-donor: anti-donor response, α-third: anti-third party response
%CD25: % of CD25 expressing cells among proliferating CD8+ T cells

これまでに行った肝臓移植症例で、CD4、CD8T細胞応答の Stimulation Index (SI) および CD8T細胞の CD25 表出率の解析結果による免疫状態のカテゴリー分類に基づき免疫抑制剤の減量を試みたところ、現在までに6例において免疫抑制剤完全離脱 (operational tolerance) に成功した。

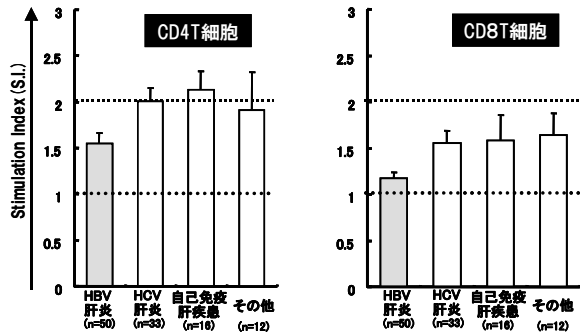
これらの患者は、一貫して抗ドナー低応答状態を維持しており、共通して肝移植後早期に抗 HBs ヒト免疫グロブリン (HBIG) あるいは免疫グロブリン静注 (IVIG) 療法がなされていた。さらに、末梢血中には Treg の有意な増加を認めた (図2)。また、non-operational tolerance 症例でも、現疾患別に移植後抗ドナー-SI を比較すると、HBIG を受けた B 型肝炎症例で抗ドナー応答の低下傾向を認めた (図3)。

図2. Operational tolerance 症例の regulatory T 細胞の存在比率



免疫抑制剤完全離脱症例 (左: n=3, 術後5-7年) の末梢血中 Treg 存在が高率であった。

図3. 肝臓移植術後長期における原疾患別での抗ドナー免疫応答性 (CFSE-MLR assay, SI:1= same as anti-self response)



この特異的抗ドナー低応答性は、B型肝炎そのものが影響するのか、あるいは投与された免疫グロブリン HBIG が関連するのか興味を持たれる。免疫グロブリン療法は、感染症に止まらず自己免疫などの免疫関連疾患や炎症に対しても良好な臨床効果が得られるが、メカニズムは不明な点が多い。最近、IVIG によって制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の増加を認める報告や、IgG-Fc 由来の合成タンパク (Regulatory T-eitope) による Treg 誘導の報告がなされた。免疫グロブリンが投与され抗原と結合すると、それを取り込んだ抗原提示細胞 (APC) は、その MHC 上に標的抗原と Regulatory T-eitope を表出し、抗原特異的な Treg が誘導されるものと考えられる。

2. 研究の目的

免疫グロブリン大量投与療法による同種異系免疫応答の制御効果および制御性 T 細胞 (Treg) の誘導機構を解明し、臓器移植における新規寛容誘導法を目指した基礎研究を行うことである。さらに、免疫制御のメカニズムを解明するための、同種異系リンパ球混合試験による反応性 T 細胞のシグナル伝達機構の解明を行うアッセイ法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

1. 抗 HBs 免疫グロブリン (HBIG) 投与によるアロ免疫応答への作用機序の解明

免疫グロブリンのアロ応答への関わりを評価するために、抗原提示能抑制効果および HLA 拘束性抑制能の有無の評価を行った。HLA 既知の健常人ボランティア末梢血から採取した DC に各種ヒト免疫グロブリン (Whole IgG, IgG-Fc, IgG-Fab, IgG-(Fab)2) を 12~24 時間作用させ、HLA の異なる健常人ボランティア末梢血リンパ球と 5 日間共培養した。その後、フローサイトメトリーを用いて免疫グロブリンを添加しないコントロール群と比較してリンパ球のアロ応答性に変化をきたすか否かを解析した。さらに、抗 HBs 免疫グロブリン (HBIG) を用いて同様の実験を行った。

2. 合成ヒト型 IgG Peptide によるアロ応答抑制効果の検討

これまでの解析で、免疫グロブリン IgG の C 末端 H 鎖 Peptide 289 と N 末端 H 鎖 Peptide167 に T 細胞に対する免疫制御能がある可能性が示唆されている。そこで、合成ヒト型 IgG Peptide 289 を作成し、健康人ボランティアの同種異系リンパ球混合試験により免疫制御能について評価した。

3. アロ応答性 T 細胞シグナル伝達機構解析法の確立

免疫制御のメカニズムを解明するための、同種異系リンパ球混合試験による反応性 T 細胞のシグナル伝達機構の解析を行うアッセイ法の確立を試みた。CD4+T 細胞は、抗原提示細胞との TCR およびサイトカイン受容体を介したシグナルにより様々な Th 分化に誘導されることが知られている。HLA の異なる健康人の末梢血単核球を用い、同種異系で MLR を行い、抗アロ応答に伴う CD4+T 細胞の細胞内 STAT シグナル発現を評価した。

4. 研究成果

1. 抗 HBs 免疫グロブリン (HBIG) 投与によるアロ免疫応答への作用機序の解明

ヒト免疫グロブリン添加によるアロ免疫応答性をフローサイトメトリーを用いて CD4、CD8T 細胞別に Stimulation index を算出した。その結果、Fc 部を含む免疫グロブリン添加群において、コントロール群に対し Stimulation Index が低く、アロ応答抑制傾向を呈した。次に、HBIG を用いて同様の実験を行ったが、抑制効果は見られなかった。

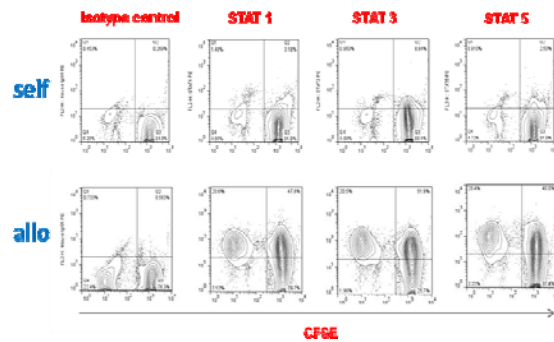
2. 合成 Peptide によるアロ応答抑制効果の検討

Peptide 289 を作成し、健康人ボランティアの同種異系リンパ球混合試験により評価した。従来の免疫抑制剤に比べ、T 細胞抑制効果は優位ではなかった。

3. アロ応答性 T 細胞シグナル伝達機構解析法の確立

アロ応答 CD4+T 細胞は、STAT1, 3, 5 の発現上昇を認めた。IL-2 添加による拒絶モデルで STAT3 および 5 の優位な増加を認め、IL-2R 抗体添加によって STAT5 のみが抑制された。また、IL-6R 抗体添加では、STAT3 の特異的抑制を認めた。この解析系を用い Peptide 289 の免疫制御機構を解析すると、全ての STAT のリン酸化を軽度抑制した。以上、免疫グロブリン由来制御性 T エピトープの免疫抑制機構を解析した。

Phospho-STAT1, STAT3, STAT5発現がアロ反応性CD4T細胞に認められた



以上の結果から、当初期待していた合成ヒト型 IgG 構成ペプチド (Regulatory T-epitope) の作成し、その免疫抑制効果の評価したが、従来の免疫抑制剤に比べ優位性は確認できなかった。しかし、STAT シグナル応答の解明により、今後、免疫抑制剤との相乗効果の可能性に期待が持たれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tanaka Y, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ishiyama K, Ohdan H. Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 44 巻. 査読あり. 2012. 555-559.

2. 田中友加、大段秀樹. 高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン大量投与のアロ免疫応答に対する影響. *今日の移植.* 24 巻. 査読なし. 2011. 103-107.

[学会発表] (計 6 件)

1. Kei Araki, Yuka Tanaka, Hideki Ohdan. A novel method for intracellular profiling of STAT activation pattern in T cells responding allostimulation. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep 26th, 2011. Seoul, Korea.

2. Yuka Tanaka, Hirotaka Tashiro, Kentaro Ide, Takashi Onoe, Kohei Ishiyama, Hideki Ohdan. Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious

complications and mortality in living-donor liver transplantation. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. Sep 26th, 2011. Seoul, Korea.

3. 田中友加、井手健太郎、尾上隆司、石山宏平、田代裕尊、大段秀樹. 成人生体肝移植における免疫監視下での免疫抑制剤の最小化: Operational tolerance の誘導. 第29回日本肝移植研究会. 2011年7月23日. 仙台市.

4. 田中友加、荒木慧、大段秀樹. アロ応答T細胞のサイトカイン産生能とSTATシグナル解析による分子標的免疫モニタリング法の開発. 第47回日本移植学会. 2011年10月6日. 仙台.

5. Yuka Tanaka, Hirotaka Tashiro, Hideki Ohdan. Optimization of immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. American Transplant Congress 2010. 2010.5.4. San Diego, USA.

6. 田中友加、井手健太郎、尾上隆司、番匠谷将孝、五十嵐友香、田澤宏文、Marlen Doskali, Nabin Basnet, 田代裕尊、大段秀樹. 肝臓移植後における自然免疫細胞移入と獲得免疫抑制の最適化による生体防御能を保持した免疫抑制療法. 第46回日本移植学会総会. 2010.10.21. 京都.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 友加 (TANAKA YUKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 90432666

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: